

REPLICATION DE L'ADN

I/ Caractéristiques fondamentales de la réplication

1. Modèle de réplication: La réplication peut se faire suivant 3 modèles représentés sur la figure 1.

-Modèle conservatif : Les deux brins ou duplex reste entiers et servent de modèle pour un duplex nouvellement synthétisé.

-Modèle semi-conservatif : fait obtenir à la première génération deux duplex formés chacun d'un brin parental et un brin nouvellement synthétisé.

-Modèle dispersif : Les brins parentaux perdent leur intégrité. Les duplex néoformés sont un mélange d'ADN parental et d'ADN nouvellement synthétisé.

Le modèle semi-conservatif répond le plus à la structure de l'ADN proposé par Watson et Crick (1953). L'expérience de Meselson et Stahl (1958) a permis de le confirmer. Ces auteurs ont utilisé deux isotopes de l'azote : un lourd ou ^{15}N et un léger ^{14}N . Cette expérience comporte les étapes suivantes :

-Incubation des bactéries dans des milieux contenant du chlorure d'ammonium ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) comme seule source d'azote.

-Rinçage des bactéries pour éliminer toute trace de $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ non utilisé.

-Incubation dans du milieu frais contenant l'isotope léger.

-Prélèvement à des temps réguliers correspondant aux générations et extraction de l'ADN.

-Centrifugation sur gradient de densité de chlorure de Césium.

Les résultats montrent que l'ADN de la première génération a une densité intermédiaire. Après la 2nd réplication, 50% de l'ADN bactérien est de densité intermédiaire et 50% de densité légère (Figure 2).

2. Sens de la réplication : La polymérase fixe le NTP par son 5' sur le OH en 3' du dernier nucléotide d'une chaîne préexistante. L'addition des nucléotides se fait donc dans le sens 5 \longrightarrow 3'.

3. Complémentarité : Les nucléotides sont polymérisés suivant les règles de complémentarité A-T et C-G.

4. Orientation : Le brin néoformé et le brin parental ou matrice sont antiparallèles.

II/ Eléments nécessaires à la réplication

Les éléments indispensables à toute réplication sont :

- Un brin parental ou matrice (template)
- Des désoxyribonucléotides ou dNTP: dATP, dCTP, dGTP et dTTP
- De l'énergie fournie par la liaison phosphoester suivant la réaction :



- Des enzymes permettant le déroulement, la polymérisation....
- Un cation divalent: le Mg⁺⁺ (polymérase)

III. Synthèse de l'ADN et protéines impliquées

1. Modification du surenroulement de l'ADN : Elle est assurée par des topoisomérases et correspond au passage de la forme super enroulée à une forme relâchée. Il existe plusieurs topoisomérases.

- Topoisomérases I: assurant le passage à la forme relâchée par coupure d'1 brin
- Topoisomérase II: telle que la gyrase d'*E. coli*, assurant le passage à la forme relâchée par coupure des 2 brins.

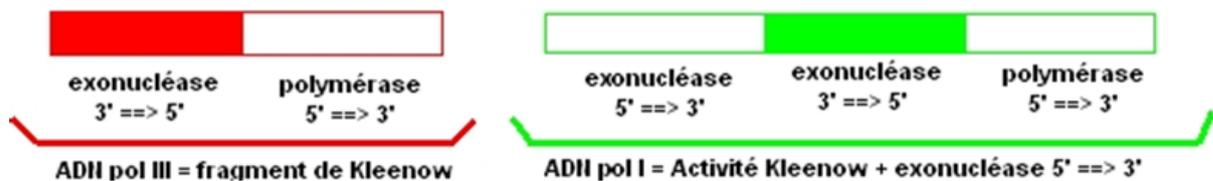
La topoisomérase I agit en établissant une liaison covalente entre une tyrosine de sa séquence et le OH en 5' du brin à couper (Figure 5). Après coupure du brin, l'élimination des super-tours peut se faire soit par passage du brin non coupé au-dessus du brin coupé ou par rotation libre et refermeture. Le 2nd procédé permet, grâce à des cycles successifs, de contrôler le nombre de rotations et par la même le relâchement.

2. Déroulement de la double hélice : Assuré par l'hélicase ou DNAb, enzyme permettant l'ouverture du duplex d'ADN par coupure des liaisons H. Les

protéines SSB (Single Strand Binding Protein) permettent le blocage du brin d'ADN et sa protection contre les enzymes (Figure 6).

3. Formation des nouveaux brins : La polymérisation est assurée par l'ADN polymérase qui additionne les nucléotides à une séquence préexistante (Figure 7). Chez les procaryotes, il existe plusieurs ADN polymérases (I, II et III). Ces enzymes ont une activité polymérasique et peuvent être douées d'activité exonucléasique.

ADN Pol	Activité enzymatique			Processivité
	Polymérase 5'----3'	Exonucléase 3'----5'	Exonucléase 5'----3'	
I	+	+	+	Basse
II	+	+	-	Basse
III	+	+	-	Elevée



Chez *E. coli*, l'ADN polymérase I est majoritaire alors que l'ADN polymérase III est celle qui est indispensable à la réplication. Elle possède une structure oligomérique et est formé de 2 dimères $\beta\beta'$, d'un ensemble $\delta\delta\psi\gamma\chi$ constituant un chargeur de pince et d'un cœur catalytique $(\alpha,\epsilon,\theta)_2$ associé à un dimère $\tau\tau$; l'ensemble constituant un replisome (Figure 8, Tableau I). Le dimère $\beta\beta'$ constitue une pince coulissante associée à l'enzyme durant la réplication d'un fragment (Figure 9).

Les ADN polymérases des cellules eucaryotes sont les polymérases α , β , γ , δ et ϵ .

IV/ Mécanismes de réplication chez les procaryotes

Le processus de réplication comprend 3 étapes principales :

1. Initiation : La réplication débute au niveau d'un œil de réplication situé au niveau d'un site appelé origine ($OriC$) de réplication correspondant à une séquence de 245 pb contenant 9 à 13 pb, riches en AT (dénaturation localisée) sur laquelle se fixent des protéines initiatrices. Il se forme alors un complexe d'initiation ou primosome formé de l'hélicase, de SSB et d'ADN primase qui synthétise les amorces d'ARN (Figure 10).

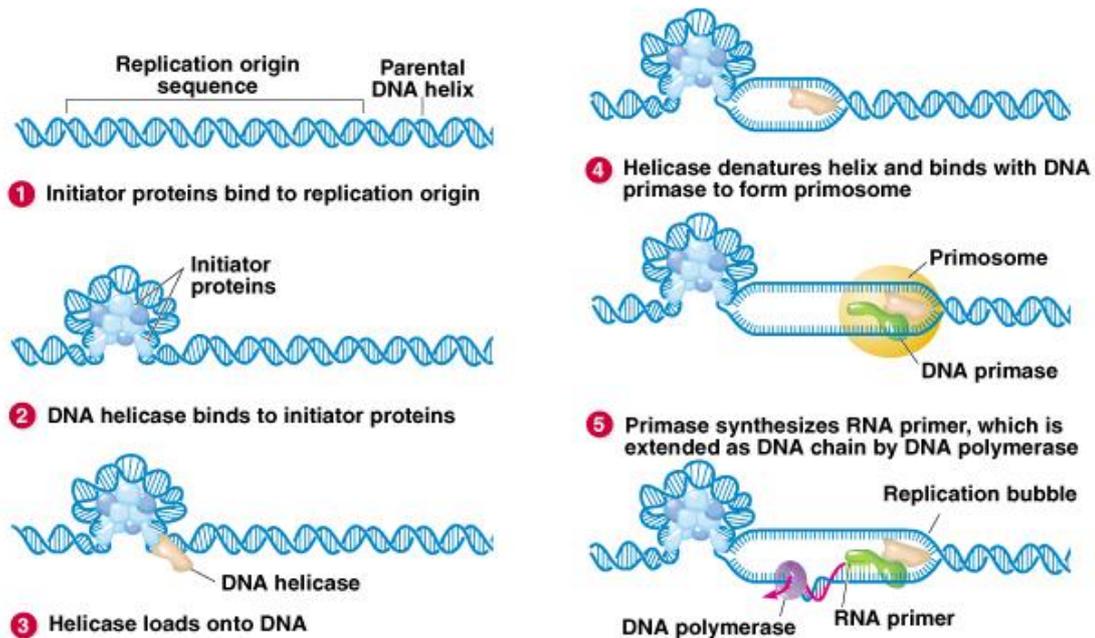


Figure : Initiation de la réplication chez *E. coli*

2. Elongation : Formation du réplisome constitué de l'ADN polymérase et l'hélicase. La progression se fait dans les deux sens (bidirectionnalité). La synthèse d'un brin est continue (Brin précoce, leading strand), celle du 2nd est discontinue et se fait sous forme de fragments d'Okasaki (Brin retardé, lagging strand) en raison de la formation d'une boucle permettant à l'ADN polymérase de progresser dans le même sens que le 1^{er} brin (Figure 11). En fin de réplication de chaque fragment, l'amorce d'ARN est éliminée et remplacée par de l'ADN par l'ADN polymérase I. Une ligase soude les fragments d'Okasaki (Figure 12).

3. Terminaison : La progression dans les deux sens du chromosome circulaire avec arrêt à l'opposé du point d'initiation, lieu de rencontre des 2 fourches de réplication et soudure des points de rencontre, permet d'obtenir deux chromosomes circulaires identiques.

V/ Mécanismes de réplication chez les eucaryotes

1. Initiation : Des séquences ARS ou séquences autonomes de répliation sont des séquences d'environ 50 pb riche en AT correspondant à l'origine. Il se forme un complexe multiprotéique ou Complexe de reconnaissance de l'origine (ORC). Ce

complexe se fixe sur des séquences ARS pour former le primosome (hélicase,SSB et ADN primase). L'initiation prend naissance en plusieurs points de l'ADN linéaire.

2. Elongation : Processus analogue à celui des procaryotes avec intervention de l'ADN polymérase δ répliquant les 2 brins précoce et retardé. Le passage de l'enzyme nécessite la dissociation des nucléosomes. La réassociation se fait dès le passage de la fourche de répllication.

3. Terminaison : Arrêt de la répllication à la rencontre de 2 fourches de répllication ou à l'extrémité des chromosomes.

VI/ Comparaison des processus de répllication chez les procaryotes et eucaryotes

Procaryotes	Eucaryotes
Répllication bidirectionnelle	
Complémentaire et anti-parallèle	
Discontinue pour un brin	
Continue durant la vie	Restreinte à une phase du cycle
Une origine	Plusieurs origines
-	Dissociation-réassociation des nucléosomes
1000 pb/s/fourche	100 pb/s/fourche

V/ Répllication des télomères

Le raccourcissement des extrémités des chromosomes en raison de l'élimination de l'amorce d'ARN la plus externe est évitée grâce à l'action de la télomérase.

1. Structure et fonction: La télomérase est une ribonucléoprotéine. Elle assure l'addition d'une séquence répétée spécifique, riche en T et G (TTGGG)_n, à l'extrémité des chromosomes. Le composant ARN de la télomérase dont la séquence est (AACCC)_n sert de matrice pour la synthèse de l'ADN.

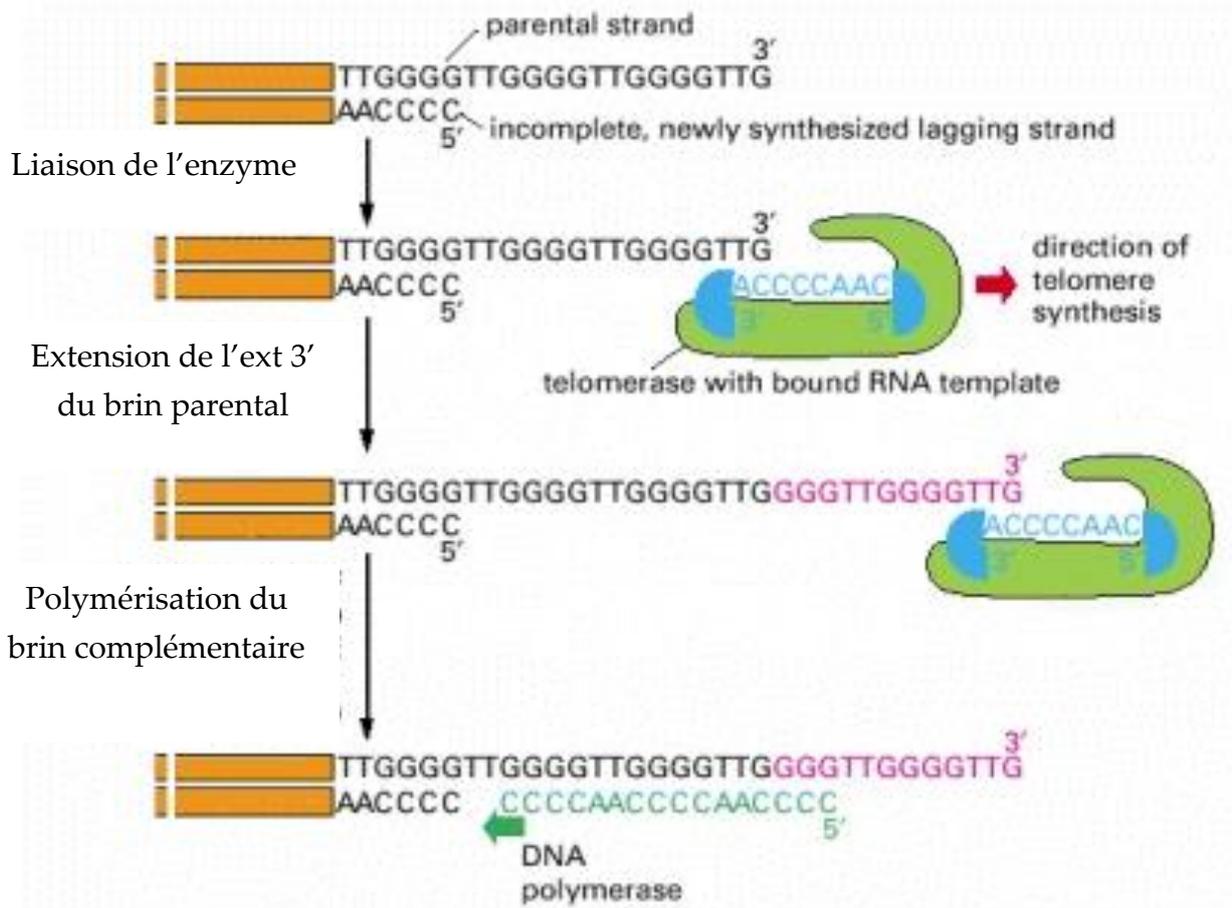


Figure : Réplication des extrémités par la télomérase

Allongement de la séquence du brin parental/ télomérase

- Le brin matrice étant l'ARN de l'enzyme
- La séquence polymérisée est TTGGG répétée
- La télomérase progresse de gauche à droite (5'---3')

Synthèse d'une amorce par l'ARN primase

Duplication du fragment parental rallongé

- Le brin matrice étant cette fois l'ADN parental
- L'amorce est du RNA nouvellement synthétisé
- L'ADN polymérase progresse de droite à gauche (5'---3').